

高通量测序技术在水产品加工贮藏中的应用

蓝蔚青^{1,2}, 孙雨晴¹, 谢晶^{1,2}

(1.上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2.上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心,
食品科学与工程国家级实验教学示范中心(上海海洋大学), 上海 201306)

摘要: **目的** 通过对水产品加工贮藏过程中微生物群落结构的动态分析, 有利于发现腐败菌及病原微生物, 以进一步提高水产品的品质, 延长其货架期。**方法** 在介绍高通量测序技术的主要特点和发展历程的基础上, 重点阐述高通量测序技术在发酵产品的生产、掺杂掺假的鉴别、食源性病原菌和腐败菌的检测等水产品加工贮藏领域中的应用, 分析并解决存在的问题, 展望高通量技术的发展前景。**结论** 随着未来生物工程领域技术水平的不断发展, 测序成本低、耗时短、准确度高的测序技术将会逐渐替代传统的检测方式, 更好地应用于水产品品质评价和微生物多样性分析中。

关键词: 高通量测序; 水产品; 微生物; 加工贮藏

中图分类号: S983 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2020)21-0011-07

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2020.21.002

Application of High-throughput Sequencing Technology in Aquatic Products during Processing and Storage

LAN Wei-qing^{1,2}, SUN Yu-qing¹, XIE Jing^{1,2}

(1.School of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2.Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Science and Engineering (Shanghai Ocean University), Shanghai 201306, China)

ABSTRACT: The work aims to find spoilage bacteria and pathogenic microorganisms through the dynamic analysis of microbial community structure during the processing and storage of aquatic products, so as to further improve the quality of aquatic products and extend their shelf life. Based on the introduction of the main characteristics and development process of high-throughput sequencing technology, the application of high-throughput sequencing technology in the processing and storage of aquatic products, such as the production of fermentation products, identification of adulterated adulterants, detection of food borne pathogens and spoilage bacteria were emphatically elaborated. The existing problems were analyzed and solved, and the development prospect of high-throughput sequencing technology was prospected. With the continuous development of biotechnology in the future, sequencing technology with low cost, short time and high accuracy will gradually replace the traditional detection methods and be better applied in aquatic product quality evaluation and microbial diversity analysis.

KEY WORDS: high-throughput sequencing technology; aquatic product; microorganism; processing and storage

收稿日期: 2020-08-14

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2019YFD0901602); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-47-G26); 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心能力提升项目(19DZ2284000)

作者简介: 蓝蔚青(1977—), 男, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为水产品保鲜技术。

通信作者: 谢晶(1968—), 女, 博士, 上海海洋大学教授, 主要研究方向为水产品保鲜技术。

我国是水产品生产、消费和出口大国,2019年全国总产量达6480.36万t,连续多年位居世界第一^[1]。水产品种类繁多,营养价值和水含量高,其携带的微生物也相对丰富。与其他产品相比,水产品更易被微生物污染而腐败,因此对其加工贮藏条件要求也较高^[2-4]。水产品的污染主要分为内源性污染和外源性污染。其中,内源性污染源于产品自身,也称一次污染;外源性污染主要是产品在生产、加工和贮藏过程中,由于操作不当或条件变化,通过空气、水等介质传播的微生物污染,也称二次污染^[2,5-6]。病原微生物对人体危害大,腐败微生物使水产品货架期缩短。另外一些不良商家受到利益驱使,在水产品加工过程中存在不同程度的掺杂掺假,与商品标签不符现象,导致消费者不能完全了解产品成分,甚至一些消费者因误食,对其中一些未标明成分出现过敏现象。提高水产品中微生物检测的准确性,有助于防止其腐败变质,确保食用安全。此外,发酵水产品因其具有特殊风味受到消费者喜爱,但目前部分发酵水产品的发酵机理不明。使用高通量测序对发酵水产品生产过程中的微生物群落进行检测,有利于进一步探究水产品发酵机理,提高发酵产品品质。由此,水产品中微生物群落结构的分析一直是国内外学者的研究热点^[7]。高通量测序技术测序通量高,可检测到低丰度菌群,样品覆盖率高,测序范围广,速度快以及准确度高,对水产品中微生物群落尤其是对不可培养的微生物研究有明显的推动作用。全面了解高通量测序技术原理及在水产品加工贮藏过程中的应用现状,使其更好地对水产品加工贮藏过程中的微生物菌群进行检测,以便针对性地对水产品进行加工生产及贮藏保鲜。文中主要介绍高通量测序技术的特点,阐述高通量测序技术在水产品加工贮藏过程中的应用,分析存在问题与解决办法,旨在为该技术更好地应用于水产品加工贮藏提供理论参考。

1 高通量测序技术的发展

水产品中微生物的检测最早以微生物纯培养为主,但此法仅能检测到少量丰度较高的优势菌,无法全面分析其微生物群落结构^[8]。近年来,随着微生物检测技术的发展,变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Electrophoresis, DGGE)^[9]与实时定量荧光聚合酶链式反应(Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)^[10]等技术逐渐得到应用。以上技术虽可满足部分水产品的微生物检测需求,但由于其中部分检测技术具有成本高、测序范围有限、无法检测到丰度较低的菌群、测序准确度较低、在检测过程中极易产生人为误差等缺点,在一定程度上限制了其在水产品中的深入应用。高通量测序技术(High Throughput Sequencing, HTS)属免培养分子生物学技术之一^[11]。1977年,Sanger的双脱氧终止法诞生,被称为第1代测序技术;随着科技进步,第2代测序技术和第3代测序技术相继出现。目前应用最广泛的是第2代测序技术(Next-generation sequencing, NGS),其主要平台有Illumina测序平台和454焦磷酸测序平台^[12]。第3代测序技术(Third generation sequencing technology, TGS)的主要平台是PacBio公司的单分子实时测序(Single Molecule Real Time, SMRT)平台。从第1代测序技术诞生,发展到第3代测序先后经历了测序长度由长到短、由短到长的变化^[13]。主要测序平台及特点见表1^[14-18]。

第2代测序技术的应用使16S rRNA基因的测序通量明显提高,为研究人员在短时间内对特定水产品中微生物动态群落进行全面分析提供可能^[16]。Illumina测序平台具有测序通量高、成本低和准确度高等特点,其占据了测序市场的主导地位,原理见图1。将大分子DNA打断成长度约为10 kb的小片段,

表1 主要测序平台及其特点
Tab.1 Major sequencing platforms and their characteristics

测序技术	主要测序平台	技术核心	优点	缺点
第1代测序技术	Sanger ABI 3730l 1st	双脱氧链终止	平均测序长度长; 准确度高	通量低; 样品制备成本高
	Roche/454	Pico Titer Plate (PTP) 平板; 焦磷酸	在第2代测序中平均测序长度最长, 比第1代的测序通量高	检测设备价格昂贵, 样品制备较难, 试剂冲洗导致准确度降低
第2代测序技术	Illumina	桥式扩增; 可逆终止子	平均测序长度较长, 测序通量和准确度高	设备昂贵, 用于数据删减和分析费用高
	Solid	双碱基测序	测序通量高, 准确度最高	测序运行时间长; 平均测序长度短
第3代测序技术	PacBio SMRT	零模波导孔	平均测序长度长, 比第1代测序耗时短; 不需扩增; 最长单个测序长度接近3000 bp	测序准确度低, 成本较高

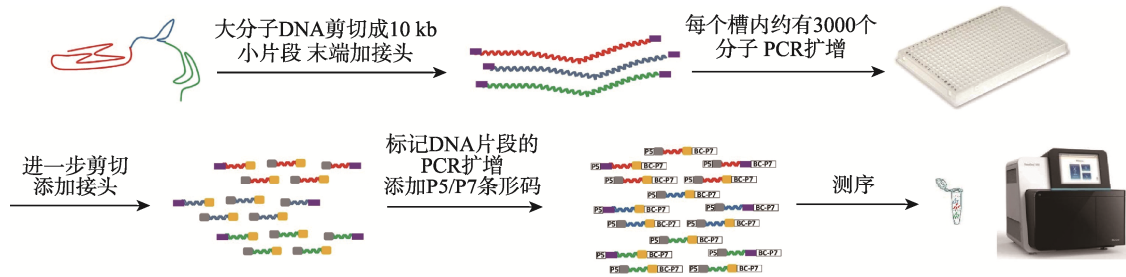


图 1 第 2 代测序技术中 Illumina 测序平台的工作原理

Fig.1 Working principle of Illumina sequencing platform in the second generation sequencing technology

末端加接头,单链 DNA 片段通过桥式扩增形成 DNA 簇,然后使用带有荧光基团的 4 种脱氧核糖核苷酸 dNTP,采用边合成边测序的方法对待测样品的 DNA 进行测序^[14]。

2 高通量测序技术在水产品加工贮藏中的应用

高通量测序技术在水产品加工贮藏领域的应用主要分为 3 个方面:发酵产品在生产过程中发酵菌群的检测;掺杂掺假鉴别以及微生物检测;通过高通量测序平台对水产品加工贮藏过程中微生物群落及物种多样性进行快速全面检测。以上技术领域的应用有利于推动水产品保鲜技术的开发与发展以及水产品品质的不断提升。

2.1 发酵产品的生产

水产品发酵机理复杂,涉及多种微生物的共同作用^[19]。一些微生物对发酵水产品中特定风味的形成起主导作用,分析发酵水产品中的微生物群落,有利于确定其最佳发酵条件。目前大多采用传统培养法或克隆技术分析其微生物群落,其局限较大,存在低丰度菌群无法检测、测序范围有限、准确度低等缺点,利用高通量测序技术则能解决此类问题。其中,ROH 等^[20]通过焦磷酸测序首次检测到发酵海鲜中存在克雷纳氏菌群,并发现古菌在海鲜发酵过程中的多样性高于细菌,发酵海产品中的古菌主要是极端嗜盐古菌的盐杆菌科和中温泉古菌的泉古菌门群 I.1、深海群 B 与杂泉古菌门群,然而目前这些中温泉古菌类群还鲜在其它的发酵食品中检测出;DUAN 等^[21]通过高通量测序对发酵虾酱风味形成阶段的细菌群落进行全面分析,结果表明,在虾酱发酵过程中,嗜盐四生球菌丰度最高,此外还检测到对风味产生有益的卡诺杆菌、假单胞菌等,其丰度较低;吴燕燕等^[22]比较了在传统法和乳酸菌法下加工腌干鱼的微生物群落变化,结果得出在传统加工条件下,腌干鱼微生物的组成较为单一,主要为弧菌科、葡萄球菌科和假单胞菌科等,接种乳酸菌发酵剂后,其细菌多样性增加,乳酸菌成为优势菌;JUNG 等^[23]通过焦磷酸测序首次揭示了温

度对鱼露在发酵过程中微生物群落和代谢产物变化影响。细菌群落分析表明,不同凤尾鱼的初始菌群差异是鱼露产品品质优劣的主因。高通量测序对发酵产品生产中的菌群全面检测,有利于发现低丰度发酵有益菌,深度探索发酵机理,提高水产品的发酵工艺。

2.2 掺杂掺假鉴别

部分水产品经深加工处理后,其原始形态发生改变,少数不良商家受经济利益驱使,会在成本较高的水产加工品中添加其它廉价原料,其以次充好、掺杂掺假的行为严重欺骗了消费者,还会对其健康带来不良影响^[24]。随着高通量测序技术的发展,该技术已成为水产加工品掺伪检测中的关键技术。通过使用 COI 长条形码或 16S rRNA 微条形码作为分子标记,进行 PCR 扩增,再对扩增产物进行测序,可快速准确检测物种组成。王楠等^[25]通过高通量测序的 DNA 条形码技术检测了 18 份市售鲑科水产品中的物种组成,结果发现只有一份样品成分单一,其余样品均有不同程度的标签不符情况,且发现其中除掺入廉价鱼类,猪、鸡、鸭等非水产类物种也在掺杂样品中;GVNTER 等^[26]对细胞色素氧化酶 I 基因全长和部分片段条形码进行扩增,之后对 118 种水产品进行高通量测序,结果表明,完整长度条形码引物的扩增成功率为 67.8%,并将样品组成确定至物种水平。高通量测序样品覆盖率高,可快速检测到低丰度物种,对样品中物种组成进行全面检测,使得消费者权益得到更好的保障,提高水产品品质。

2.3 微生物检测

在水产品加工贮藏过程中的微生物污染不可避免,虽然部分微生物在水产品中丰度并不高,但仍会导致食源性疾病的发生,对消费者的健康带来不良影响,有必要对水产品加工生产过程中各个环节进行严格监督把控。高通量测序技术可全面了解微生物病原体的生长动态和生理特性,检测出食品中的食源性病原微生物。日本因食用生鱼爆发的不明食源性疾不断增加,患者在进食生鱼片后数小时内出现腹泻和呕吐现象,为确定病源,KAWAI 等^[27]通过 Sanger 测序技术检测到比目鱼中存在粘孢子虫 (*Kudo aseptem-*

punctata), 由动物实验验证首次得出, 该粘孢子虫为此次食源性疾病的来源; CHAN 等^[28]通过第三代高通量测序技术从腌制鲭鱼生鱼片中分离得到奈氏西地西致病菌, 首次获得了该菌的完整序列, 该菌会破坏人体的免疫功能, 导致败血症、内心膜炎和全身性红斑狼疮。对病原菌进行测定使得人们更全面地了解病原菌致病机理, 有利于从源头对其进行控制。

水产品中微生物种类繁多, 特定腐败菌(Specific spoilage organisms, SSOs) 在水产品腐败变质中起主要作用^[8]。水产品中的优势腐败菌种类和数量因其品种、环境条件、贮藏温度和贮藏时间等不同存在差异。高通量测序可对水产品贮藏过程中不同阶段的微生物群落进行动态分析, 其覆盖率高, 可检测出低丰度菌群。李成等^[29]通过高通量测序技术分析得出, 蟹糊在不同贮藏温度下微生物的多样性、丰度及优势菌群等均存在差异, 与在-20℃贮藏条件下的样品相比, 在4℃贮藏条件下的样品中 *Jeotgalibaca* 和葡萄球菌属所占比例显著上升, 不同贮藏温度下蟹糊样品中肉食杆菌属丰度均在70%左右, 该菌是蟹糊的优势腐败菌; KUULIALA 等^[30]通过高通量测序发现, 大西洋鳕鱼在贮藏过程中, 其体内光细菌的相对丰度随贮藏时间延长呈上升趋势, 从而促进大西洋鳕鱼挥发性有机化合物的产生, 加速其腐败; JIA 等^[31]通过高通量测序研究了 ϵ -聚赖氨酸和冰藏对南美白对虾在贮藏期间微生物的影响, 结果表明, 各组样品在贮藏初期的相似性较高, 在贮藏后期的微生物组成差异较大, 表明 ϵ -聚赖氨酸和冰藏完全改变了微生物群的组成, 延缓了南美白对虾的腐败进程; ZHANG 等^[11]采用高通量测序技术研究了真空或气调包装对轻盐草鱼鱼片微生物组成的影响, 结果得出假单胞菌是空气包装草鱼片的优势菌, 乳酸菌是真空包装和气调包装草鱼片的优势菌; WANG 等^[32]分析了根皮素对大西洋鲑鱼鱼片贮藏期间微生物群落组成的影响, 测序结果表明, 假单胞菌、光细菌与希瓦氏菌、不动杆菌、黄杆菌与温杆菌是三文鱼鱼片在贮藏期间的优势菌群, 根皮素降低了鲑鱼鱼片微生物物种多样性和细菌群落组成的相对丰度水平, 能有效抑制单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌等菌体的生长。

3 存在问题和解决办法

高通量测序技术在水产品发酵产品生产、掺杂掺假、病原菌和腐败菌的检测中发挥着重要作用。目前, 该技术在水产品研究领域仍然存在一定局限性。首先, 由于测序前在提取样品的总DNA中存在已死亡但暂未降解的微生物DNA, 高通量测序无法确定所检测到的微生物是否存活^[33]; 其次, 高通量测序技术对细菌和古生菌的类别进行区分的基因是16S rRNA, 目前应用最广泛的二代测序技术还无法完全

覆盖该基因的全部序列, 只能选取其中的一段序列测序^[34], 因此要解决如上问题应通过相应方法予以处理。

3.1 活菌检测

叠氮溴化丙锭(Propidium Monoazide, PMA)是一种能有效区分菌体存活状况的新型核酸染料。肖莉莉等^[33]首次尝试在高通量测序前使用PMA筛选出菌体中的活菌, 再利用高通量测序平台对不同温度下南美白对虾中的微生物多样性进行分析, 结果表明, PMA对低温下微生物多样性分析的修正效果较好; 赵飞等^[35]利用PMA与变形梯度凝胶电泳和高通量测序技术结合, 构建了活菌多样性分析技术, 结果表明, 与对照组相比, 经PMA处理的南美白对虾中微生物组成差距较大; CHAILLOU 等^[36]通过 NucleoSpin PlantII 试剂盒将非活性微生物细胞剔除。此外, 由于RNA易降解, 后期可通过提取样品中的总RNA, 由逆转录酶将其转为cDNA, 进一步检测其活菌数^[37]。

3.2 特定区域检测

目前, 应用最广泛的第2代测序技术只能检测部分基因片段, 且针对16S rRNA的扩增区域还尚无统一标准, 无专门针对水产品基因扩增的引物。有研究分析了2013个完全测序的细菌和古细菌基因组, 在952个基因组中发现585个物种基因组发生变异, 其会导致微生物群落多样性被高估, 其中V1和V6区域最易发生基因组内变异, V4和V5区的基因组变异性最低^[38-39]。有研究发现相同贮藏条件下蟹糊V1—V3, V3—V4区域扩增所得微生物菌属有所差异, V3—V4与V1—V3区域相比, 所得微生物的丰富性更高。另有前人研究得出, V3—V4或V4—V5区域更适合评估高通量测序平台的测序能力, 且有通用的引物适合扩增大多数的原核生物类群, 因此, 一般选取这2个区域测序分析^[40-41]。其中, V3—V4区被广泛用于鲈鱼^[42]、草鱼^[11]、梭子蟹^[29]和南美白对虾^[31]等水产品加工贮藏过程中的腐败菌检测, 多数研究者在发酵水产品中选取V4区域测序^[22]。第3代测序平台克服了二代测序技术只能检测部分基因片段的局限性, 能实现对V1—V9区域所有基因测序, 但其使用成本高, 测序结果准确性也不及二代。由此, 后期可在水产品微生物群落结构检测中结合第2代SOLiD测序结果, 对第3代SMRT测序结果予以校正。

3.3 与其它微生物检测技术结合

3.3.1 与DGGE技术结合

DGGE技术可直观反映样品中微生物的组成情况, 但受到变色剂范围的限制, 也有研究人员选用高通量测序技术对结果予以补充。王玉荣等^[43]采用

DGGE 技术对恩施地区腊鱼的细菌多样性进行了分析,结果表明,腊鱼样品中的微生物以嗜冷菌属和乳酸杆菌属为主。同时,高通量测序结果也显示样品中含有乳酸杆菌,并检测出 DGGE 未检到的环丝菌、假单胞菌、金黄色葡萄球菌等优势菌属及其它低丰度菌属;高通量测序技术由于缺乏标准化的程序,尚未用于研究与鱼粘液相关的微生物,因此,PIMENTEL 等^[44]利用 454 焦磷酸测序平台结合 DGGE 技术共同分析了不同品种鲈鱼表面皮肤粘液细菌的组成,并准确追踪了其来源。

3.3.2 与实时定量荧光聚合酶反应结合

将高通量测序技术与实时荧光定量聚合酶反应结合,可全面检测样品中微生物种群的组成状况。曾地刚等^[45]通过对 IHNV 感染与对照凡纳滨对虾进行高通量测序,发现了 221 个差异表达基因。通过实时荧光定量 PCR,验证了高通量测序数据统计的基因表达差异结果具有可靠性;赵梦迪等^[46]利用高通量测序研究了东黄海域鱼类物种的多样性和丰度信息,针对龙头鱼设计了特异性引物,采用荧光定量聚合酶方法对其资源量进行预测,结果显示,其大多数位于北纬 31 度和北纬 32 度的海域,与历史捕捞调查的结果一致。

4 结语

高通量测序技术在水产品加工贮藏中应用广泛,具有测序通量大,可同时检测多组平行样品,样品覆盖率高,可检测到低丰度菌群等优点,随着近年来该技术的快速发展,给全面深入认识水产品发酵机理和腐败机制、快速检测其物种组成以及采取相对应的预防控制措施提供了可能,推动了水产品保鲜技术的开发,提升了水产品的品质。如果要进行更精准的分析,则需结合其它测序技术对水产品中的微生物群落结构给予综合分析。由此,后期可考虑从以下几方面完善高通量测序技术。

1) 由于测序结果产生的微生物信息量大,对于当前一些无标准对照的未知序列,其所产生的信息如何进行更高效的整合将是下一步的改进方向。

2) 部分真菌会对水产品的加工贮藏产生影响,而高通量测序技术目前在水产品中多用于细菌检测,还未涉及真菌检测,后期可适当扩大其测序范围。

3) 不同的高通量测序平台间未建立可靠相通的生物学信息评价系统。可考虑后期建立综合生物学信息评价系统,推动其准确度的明显提升。

相信随着未来生物工程领域技术水平的不断发展,测序成本低、耗时短、准确度高的测序技术将会逐渐替代传统检测方式,更好地应用于水产品品质评价和微生物多样性分析中。

参考文献:

- [1] 2020 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 44.
2020 China Fishery Statistics Yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 44.
- [2] 向文瑾, 徐媛聪, 许文涛. 水及水产品中微生物快速检测技术研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2016, 6(1): 45—52.
XIANG Wen-jin, XU Ai-cong, XU Wen-tao. Progress of Rapid Detection Technology of Microorganisms in Water and Aquatic Products[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2016, 6(1): 45—52.
- [3] 原林, 丁长河. 冷藏食品中的常见微生物及其防控[J]. 粮食与食品工业, 2016, 23(6): 29—33.
YUAN Lin, DING Chang-he. Common Microorganisms in Refrigerated Storage Food and Preventive Measures[J]. Cereal and Food Industry, 2016, 23(6): 29—33.
- [4] 蓝蔚青, 冯豪杰, 刘大勇, 等. 微生物源生物保鲜剂对水产品腐败菌作用机制研究进展[J]. 包装工程, 2020, 41(5): 31—38.
LAN Wei-qing, FENG Hao-jie, LIU Da-yong, et al. Research Progress on Mechanism of Microbial Source Bio-preservatives on Spoilage Bacteria of Aquatic Products[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(5): 31—38.
- [5] YAO X F, ZHANG J M, TIAN L, et al. The Effect of Heavy Metal Contamination on the Bacterial Community Structure at Jiaozhou Bay, China[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 48(1): 71—78.
- [6] 刘文, 岳琪琪, 龚恒, 等. 包装调控方式对冷鲜鲟鱼肉微生物的抑制作用[J]. 包装工程, 2020, 41(9): 59—66.
LIU Wen, YUE Qi-qi, GONG Heng, et al. Inhibition of Microorganisms in Chilled Fresh Sturgeon Meat by Packaging Regulation[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(9): 59—66.
- [7] 张怡君. 水产品中的微生物检测方法研究进展[J]. 生物技术世界, 2016(4): 327.
ZHANG Yi-jun. Research Progress of Microbial Detection Methods in Aquatic Products[J]. Biotech World, 2016(4): 327.
- [8] 曹荣, 张井, 孟辉辉, 等. 高通量测序与传统纯培养方法在牡蛎微生物群落分析中的应用对比[J]. 食品科学, 2016, 37(24): 137—141.
CAO Rong, ZHANG Jing, MENG Hui-hui, et al. Microbial Flora Analysis of Oyster: a Comparison between Traditional Plate Incubation Method and High Throughput Sequencing Technology[J]. Food science, 2016, 37(24): 137—141.
- [9] MIRAGOLI F, PATRONE V, ROMANIELLO F, et al. Development of an S-layer Gene-based PCR-DGGE Assay for Monitoring Dominant *Lactobacillus Helve-*

- ticus* Strains in Natural whey Starters of Grana Padano Cheese[J]. *Food Microbiology*, 2020, 89: 103457.
- [10] MOUGIN J, ROQUIGNY R, TRAVERS M A, et al. Development of a MreB-targeted Real-time PCR Method for the Quantitative Detection of *Vibrio Harveyi* in Seawater and Biofilm from Aquaculture Systems[J]. *Aquaculture*, 2020, 735337. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735337>.
- [11] ZHANG Jing-bin, LI Yan, LIU Xiao-chang, et al. Characterization of the Microbial Composition and Quality of Lightly Salted Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idellus*) Fillets with Vacuum or Modified Atmosphere Packaging[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 293: 87—93.
- [12] GOODWIN S, MCPHERSON J D, MCCOMBIE W R. Coming of Age: Ten Years of Next-generation Sequencing Technologies[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17(6): 333—351.
- [13] SCHLOSS P D, JENIOR M L, KOUMPOURAS C C, et al. Sequencing 16S rRNA Gene Fragments Using the PacBio SMRT DNA Sequencing System[J]. *PeerJ*, 2016, 4(3): e1869.
- [14] DIJK V E L, YAN J, NAQUIN D, et al. The Third Revolution in Sequencing Technology[J]. *Trends in Genetics*, 2018, 34(9): 666—681.
- [15] 郭清艳, 钮冰, 杨捷琳. 下一代测序技术在食源性致病细菌研究中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017(4): 1332—1338.
- GUO Qing-yan, NIU Bing, YANG Jie-lin. Application of Next-generation Sequencing Technology in the Study of Foodborne Pathogens [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017(4): 1332—1338.
- [16] 唐勇, 刘旭. 基于 SMRT 测序技术的 16S rRNA 基因全长测序及其分析方法[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(8): 34—39.
- TANG Yong, LIU Xu. Full-length Sequencing of 16S rRNA Gene and Its Analysis Based on the SMRT Sequencing Technology[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(8): 34—39.
- [17] QUAIL M, SMITH M E, COUPLAND P, et al. A Tale of Three Next Generation Sequencing Platforms: Comparison of Ion torrent, Pacific Biosciences and Illumine MiSeq Sequencers[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 341.
- [18] MCCARTHY A. Third Generation DNA Sequencing: Pacific Biosciences" Single Molecule Real Time Technology[J]. *Chemistry & Biology*, 2010, 17(7): 675—676.
- [19] FILIPPIS F D, PARENTE E, ERCOLINI D. Metagenomics Insights into Food Fermentations[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(1): 91—102.
- [20] ROH S W, KIM K H, NAM Y D, et al. Investigation of Archaeal and Bacterial Diversity in Fermented Seafood using Barcoded Pyrosequencing[J]. *ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2010, 4(1): 1—16.
- [21] DUAN Shan, HU Xiao-xi, LI Meng-ru, et al. Composition and Metabolic Activities of the Bacterial Community in Shrimp Sauce at the Flavor-forming Stage of Fermentation as Revealed by Metatranscriptome and 16s rRNA Gene Sequencings[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2016, 64(12): 2591.
- [22] 吴燕燕, 钱茜茜, 李来好, 等. 基于 Illumina MiSeq 技术分析腌干鱼加工过程中微生物群落多样性[J]. *食品科学*, 2017, 38(12): 1—8.
- WU Yan-yan, QIAN Xi-xi, LI Lai-hao, et al. Microbial Community Diversity in Dried-Salted Fish during Processing Revealed by Illumina MiSeq Sequencing[J]. *Food science*, 2017, 38(12): 1—8.
- [23] JUNG J Y, LEE H J, CHUN B H, et al. Effects of Temperature on Bacterial Communities and Metabolites during Fermentation of Myeolchi-Aekjeot, a Traditional Korean Fermented Anchovy Sauce[J]. *Plos One*, 2016, 11(3): e0151351.
- [24] MINOUDI S, KARAIKOU N, AVGERIS M, et al. Seafood mislabeling in Greek market using DNA barcoding[J]. *Food Control*, 2020, 113: 107213.
- [25] 王楠. 基于 DNA 条码技术的食品中鲑科鱼物种成分鉴别研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019: 25—50.
- WANG Nan. Identification of Salmonid (*Salmonidae*) Species in Food Using DNA Barcoding[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2019: 25—50.
- [26] GVNTER B, RAUPACHM J. and KNEBELSBERGER T. Full-length and Mini-length DNA Barcoding for the Identification of Seafood Commercially Traded in Germany[J]. *Food Control*, 2016, 3(73): 1—8.
- [27] KAWAI T, SEKIZUKA T, YAHATA Y, et al. Identification of *Kudo Aseptempunctata* as the Causative Agent of Novel Food Poisoning Outbreaks in Japan by Consumption of *Paralichthys Olivaeusc* in Raw Fish[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 54(8): 1046—1052.
- [28] CHAN Kok-gan, TAN Kian-hin, YIN Wai-fong, et al. Complete genome sequence of *Cedecea Neteri* strain SSMD04, a Bacterium Isolated from Pickled *Mackerel Sashimi*[J]. *Genome Announc*, 2014, 2(6): e0133914.
- [29] 李成, 孔晓雪, 余炬波, 等. 基于高通量测序分析蟹糊微生物菌群多样性[J]. *食品科学*, 2020, 41(4): 134—139.
- LI Cheng, KONG Xiao-xue, YU Ju-bo, et al. Analysis of Microbial Diversity of Crab Paste Based on High-throughput Sequencing[J]. *Food Science*, 2020, 41(4): 134—139.
- [30] KUULIALA L, HAGE Y A, IOANNIDIS A G, et al. Microbiological, Chemical and Sensory Spoilage Analysis of Raw Atlantic Cod (*Gadus Morhua*) Stored under Modified Atmospheres[J]. *Food Microbiology*,

- 2018, 70: 232—244.
- [31] JIA Shi-liang, LIU Yi-ming, ZHUANG Shuai, et al. Effect of ϵ -polylysine and Ice Storage on Microbiota Composition and Auality of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Stored at 0 °C[J]. Food Microbiology, 2019, 83: 27—35.
- [32] WANG Jing, FANG Jie, WEI Li-na, Zhang Y, et al. Decrease of Microbial Community Diversity, Biogenic Amines Formation, and Lipid Oxidation by Phloretin in Atlantic Salmon Fillets[J]. Food Science and Technology, 2019, 101: 419—426.
- [33] 肖莉莉. 叠氮溴化丙锭 (PMA) 应用于南美白对虾中食源性致病菌活菌检测及微生物多样性分析的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 43—54.
XIAO Li-li. Application of Propidium Monoazide (PMA) on the Detection of Foodborne Pathogen and Microbial Diversity in Shrimp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016: 43—54.
- [34] 王伟, 冷凯良, 刘均忠, 等. 微生物扩增子高通量测序技术在水产品加工与贮藏中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(10): 263—268.
WANG Wei, LENG Kai-liang, LIU Jun-zhong, et al. High-throughput Microbial rRNA Amplicon Sequencing in the Study of Processing and Storage of Aquatic Food Products[J]. Food and Fermentation Industry, 2017, 43 (10): 263—268.
- [35] 赵飞. 活菌多样性分析技术解析酸性电解水处理后南美白对虾中微生物多样性变化[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017: 45—60.
ZHAO Fei. Analysis of Microbial Diversity in Shrimp after Acidic Electrolyzed Water Treatment Using the Technique of Living Bacteria Diversity Analysis[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017: 45—60.
- [36] CHAILLOU S, CHAULOT-TALMON A, CAEKEBEHE H, et al. Origin and Ecological Selection of Core and Food Specific Bacterial Communities Associated with Meat and Seafood Spoilage[J]. The ISME Journal, 2015, 9(5): 1105—1118.
- [37] CEUPPENS S, LI D, UYTENDAELE M, et al. Molecular Methods in Food Safety Microbiology: Interpretation and Implications of Nucleic Acid Detection[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2014, 13: 551—577.
- [38] DIETER M T, SATOWA Y, AKIKO O, et al. Synthetic Spike-in Standards for High-throughput 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 25(12): 2311.
- [39] HIERGEIST A, REISCHL U. Multicenter Quality Assessment of 16S Ribosomal DNA-sequencing for Microbiome Analyses Reveals High Inter-center Variability[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2016, 306(5): 334—342.
- [40] SUN D L, JIANG X, WU Q L, et al. Intragenomic Heterogeneity of 16S rRNA Genes Causes Overestimation of Prokaryotic Diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962—5969.
- [41] MARCEL M P, ENRIQUE V C, ENRIQUE O S L, et al. How Conserved are the Conserved 16S-rRNA Regions[J]. PeerJ, 2017, 5: e3036.
- [42] 张皖君, 蓝蔚青, 段贤源, 等. 基于高通量测序分析不同保鲜冰处理对鲈鱼菌群组成与代谢功能的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(5): 234—241.
ZHANG Wan-jun, LAN Wei-qing, DUAN Xian-yuan, et al. Analysis of Bacterial Community Composition and Its Metabolic Function in *Lateolabrax Japonicus* with Different Ice Treatments by High-throughput Sequencing[J]. Food science, 2019, 40(5): 234—241.
- [43] 王玉荣, 廖华, 赵慧君, 等. 基于PCR-DGGE与高通量测序技术的恩施地区腊鱼细菌多样性评价[J]. 现代食品科技, 2018, 34(11): 208—213.
WANG Yu-rong, LIAO Hua, ZHAO Hui-jun, et al. Evaluation of the Bacterial Diversity in Cured Fish Samples Collected from Enshi by PCR-DGGE and Miseq High-throughput Sequencing[J]. Modern Food Technology, 2018, 34(11): 208—213.
- [44] PIMENTEL T, MARCELINO J, RICADO F, et al. Bacterial Communities 16S rDNA Fingerprinting as a Potential Tracing Tool for Cultured Seabass (*Dicentrarchus Labrax*)[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 11862.
- [45] 曾地刚, 陈秀荔, 谢达祥, 等. 利用高通量测序技术分析 IHNV 感染凡纳滨对虾的基因差异表达[J]. 南方农业学报, 2013, 44(11): 1899—1903.
ZENG Di-gang, CHEN Xiu-li, XIE Da-xiang, et al. Analysis of Gene Differential Expression of *Penaeus Vannamei* Infected with IHNV by High Throughput Sequencing[J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44 (11): 1899—1903.
- [46] 赵梦迪. 利用环境 DNA 分析冬季中国东黄海水域鱼类多样性[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017: 32—48.
ZHAO Meng-di. Analysis of the Fish Diversity of the East China Sea and the Yellow Sea in Winter Using Environmental DNA[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017: 32—48.